

学习记忆障碍动物模型及行为学检测指标的评析

罗燕,陈真

(中国药科大学药学医学基础实验教学中心,江苏南京 211198)

摘要:学习记忆功能受损给人类健康和生活质量造成了严重的威胁,此类新药研发过程中急需构建合适的学习记忆障碍模型以及精准的评价方法。目前国内实验者在选择实验模型和检测指标时存在困惑,该文在文献检索的基础上,对几种学习记忆障碍模型和评价指标进行了对比性实验,得出了一些收获与体会,以期对改善学习记忆的药物研发有所帮助。

关键词:学习记忆障碍模型;行为学检测指标

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.02.003

Research progress on impaired learning and memory animal model and behavioral detection method

LUO Yan, CHEN Zhen

(China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211198, China)

Abstract: The damage of learning and memory function caused serious threat to human health and quality of life, it is urgent to build appropriate learning and memory impairment model and accurate evaluation method in new drug research and development. At present, there is confusion in the choice of experimental model and detection index, I, on the basis of the literature retrieval of several learning and memory impairment model and evaluation index has carried on the comparative experiment, obtained some results and experience, hope to help improve the learning and memory of drug development.

Keywords: learning and memory impairment model; behavioral detection method

随着社会的进步、人口老龄化的发展、生活方式的改变、环境的恶化以及社会竞争压力的增大,阿尔茨海默病、血管性痴呆、抑郁症等神经性相关疾病的发生概率大大增加,而这些神经性相关疾病都伴随着学习记忆障碍。有资料预测,截止到2050年美国痴呆人口数量将由450万上涨到1.14亿^[1]。学习记忆障碍模型和行为学检测方法是新药研发中至关重要的环节。因此构建学习记忆障碍动物模型以及完善行为学检测方法,以期更好的研发出治疗学习记忆障碍药物显得极其重要。针对目前国内实验者在实验模型和检测指标时的选择困惑,笔者在文献检索的基础上,对以下模型和检测指标进行了对比性实验,得出了一些收获与体会,总结如下。

1 学习记忆障碍模型的构建

目前学习记忆障碍的发病机制大致可分为以下5个类别:脑外伤引起记忆受损;脑内的 β -淀粉样失衡、胆碱能失衡、蛋白合成异常、基因表达异常导致的学习记忆障碍;脑缺血缺氧导致自由基损

伤、钙平衡失调、兴奋性毒性及神经细胞死亡而诱导的学习记忆障碍;衰老导致神经细胞的自然老化引起学习记忆功能衰退;精神、心理异常导致的皮层萎缩促使学习记忆障碍发生。构建学习记忆障碍模型主要从记忆的3个阶段入手,即破坏记忆的获取、巩固、再现。目前国内外常用的学习记忆障碍动物模型的构建方法如下。

1.1 东莨菪碱诱导的记忆获得障碍 东莨菪碱是一种非选择性M胆碱能受体抑制剂,它能够阻断胆碱能信号通路,抑制乙酰胆碱传递从而减弱海马的长时增效^[2]。此模型主要用于筛选作用于胆碱能受体的药物,由于东莨菪碱对动物的损伤是可逆的,只能部分模拟阿尔茨海默病的病症,这就限制了该模型的发展。训练前腹腔注射 $3\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的东莨菪碱,给药10 min后对雌雄小鼠皆可造成记忆获得障碍^[3]。

1.2 亚硝酸钠诱导的记忆巩固障碍 亚硝酸钠是一种脑缺氧剂,进入机体后会造机体产生高铁血红蛋白血症。高铁血红蛋白与羟基结合会造成其不能与氧结合,从而导致脑缺氧,进而引起脑内一些神经递质,如 γ -氨基丁酸(GABA)、多巴胺(DA)、乙酰胆碱的浓度失衡,以及神经元的可塑性改变和

坏死^[4]。训练后立即单次腹腔注射亚硝酸钠 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 即可构建小鼠记忆巩固障碍模型^[5]。

1.3 乙醇诱导的记忆再现障碍 乙醇是一种中枢性抑制剂,会导致中枢神经系统中的细胞产生毒性反应^[6]。乙醇可通过影响注意力、自控功能、情绪等来诱发学习记忆障碍^[7]。乙醇可使脂质过氧化、活性氧大量累积促使氧化应激最终损害胆碱能神经系统^[8]。在测试前 30 min 灌胃低浓度的乙醇即可明显破坏记忆过程,造成学习记忆再现障碍^[9]。

1.4 D-半乳糖诱导的记忆再现障碍 D-半乳糖亚急性衰老模型是在一定时间内连续皮下注射大剂量 D-半乳糖,引起糖代谢紊乱导致脑细胞受损。高剂量的 D-半乳糖一方面在半乳糖氧化酶的作用下生成乙醛糖和过氧化氢,促使超氧阴离子和氧自由基大量产生,大量的自由基使脂质过氧化物形成,导致细胞功能障碍,使细胞代谢功能下降,从而发生一系列与老化相似的病理变化^[10-11];另一方面在游离氨基的协作下使蛋白和多肽的结构改变,通过非酶糖化作用促使晚期糖基化终末产物(AGEs)累积,最终导致脑内氧化损伤^[12]。4 周内每天给予 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ D-半乳糖即可构建学习记忆障碍模型^[13]。

1.5 β 淀粉样蛋白(A β) 沉积诱导的记忆障碍

A β 是由 A β 前体蛋白(APP)水解而来的多肽,能够抑制乙酰胆碱转移酶的活性进而导致胆碱能神经失衡^[14]。脑内过量的 A β 沉积会促使神经元细胞变性、炎性反应发生、氧化应激、tau 蛋白高度磷酸化形成神经元纤维缠结,最终导致细胞死亡^[15]。A β 沉积同时会影响钾离子通道、NMDA 受体、电压门控性钙通道等离子通道的开放,最终促使钙平衡失调引发学习记忆障碍^[16]。在鼠的第三脑室注射 A β 后,A β 在脑区域内累积造成学习记忆障碍,这种学习记忆损伤方式与阿尔兹海默病的形成方式高度类似^[17]。

2 学习记忆障碍模型的行为学检测方法及评析

行为学检测是基于条件反射的一种实验方法,目前国内应用较为广泛的是以被动逃避条件反射为基础的跳台法、Y 迷宫法、避暗法以及 Morris 水迷宫法。

2.1 跳台法 装置大小为 $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$, 平均分成 5 间,底面是可以通 36 V 连续电刺激的铜栅,每个反应箱内右后角置一高度和直径均为 4.5 cm 的平台。

训练时将小鼠于测试箱内适应环境 3 min 后,确定小鼠均位于铜栅后,立即通电,受电击后,小鼠

跳到安全平台躲避电击。记录小鼠第一次跳上跳台的反应时间(学习潜伏期)和 5 min 内受到的电击次数(学习错误次数),这两项为学习成绩。测试时,小鼠放于跳台上,记录小鼠第一次跳下跳台的时间(记忆潜伏期)和 5 min 内错误次数,5 min 内未跳下跳台的小鼠其潜伏期按 300 s 计算,这两项为记忆成绩^[18]。

跳台法优缺点:装置简单易操作,灵敏度高,能同时操作 5 只动物,较好地进行组间平行实验。缺点是当动物站立在同一根刺激电极时,足底逃避电击,出现误差;电刺激对动物损伤大;动物个体差异大,需加大样本量或进行预实验筛选。

2.2 Y 迷宫法 由 3 条等长的臂和其交界区组成,底面有等距的电栅,内侧壁贴有导电的铜片,各臂末端均装有刺激信号灯。控制面板由电压显示区、电压调节旋钮和“ I、II、III、0”4 个按键组成。按下 I、II、III 键时,所对应臂的刺激信号灯亮,此时该臂为安全区,不亮灯的两臂及交界区在 2 s 后均通电成为非安全区。按下 0 键,只有交界区通电。

训练时将小鼠放入未通电的迷宫中适应 5 min,再将小鼠放入任意一个臂,另外两支臂中一支以灯光信号表示安全区。灯亮后延时 2 s 自动接通 40 V 电流,小鼠跑至安全区时让其停留 30 s,巩固记忆。训练 10 次,记录 10 次里的正确次数记为学习成绩。24 h 后记忆测试,小鼠直接跑至安全区为正确反应,记录连续 10 次训练中的正确次数和记忆潜伏期(第 1 次跑对所需时间)^[19]。

Y 迷宫法优缺点:构造简单、操作便捷、准确性较高。缺点是一次试验只能观察 1 只动物,下一只动物实验时需对仪器进行擦拭晾干确保无上一只动物气味,耗时长,较难实现组间的完全平行。

2.3 避暗法 $40 \text{ cm} \times 12 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$ 的条件反射箱是由明室和暗室及两室之间 3 cm 直径的洞口组成,箱底有等距的铜栅,暗室的铜栅可通入 36 V 电流。

训练时将小鼠头背着洞口放入明室,适应环境 3 min 后通电,通电持续 5 min,小鼠进入暗室就会遭受电击,其正确反应是回到明室。24 h 后测试,小鼠第 1 次进入暗室的时间记为潜伏期,5 min 内进入暗室的次数为错误次数,5 min 内未进入暗室的潜伏期按 300 s 计算^[20]。

避暗法优缺点:操作简单易行、对记忆再现实验有较高的灵敏度。缺点是影响因素多,耗时长。

2.4 Morris 水迷宫法 直径 120 cm、高 50 cm 的圆形水池,四周有用于辨别方向的标志。水池分为 4 个象限,直径为 9 cm 的可移动平台置于第 2 象

限,且位置固定,平台位于水下 0.5 cm 处。水池上方安装有视频采集分析系统,可以自动记录分析动物游泳轨迹。

(1)定位航行实验:历时 4 d,第 1~2 天平台可见(平台上方插有高 5 cm 的黑色旗子用于动物辨认),第 3~4 天平台不可见(撤掉旗子)。每天的同一时间,小鼠依次从第一象限开始,面朝池壁放入水中,记录从入水到上台的时间,即为逃避潜伏期。若小鼠 90 s 内没有找到平台,则实验自动结束,此时记录逃避潜伏期为 90 s,并引导小鼠置于平台 30 s。休息 10 min 后换入水点,依次训练 4 个象限。

(2)空间探索实验:训练 4 d,第 5 天撤去平台开始实验,历时 1 d。小鼠从距离原平台最远的象限开始,面朝池壁放入水中,记录入水后 90 s 自由航行的轨迹,统计小鼠穿越原平台所在位置次数,目标象限(原平台所在象限)的停留时间百分比以及穿越目标象限的次数^[21]。

水迷宫法优缺点:优点是原理简单易懂,构造简单、检测灵敏,对实验动物损伤小,不易受气味影响,实验数据较丰富能更好地完整地体现出学习记忆差异。缺点是对实验条件要求较高,水温、平台高度、声音、实验时间、入水的朝向、高度都应该尽量一致;单次定位航行训练时间的设定有较大的经验性,个体差异较大。

3 小结与展望

迄今为止,猴、啮齿类动物、蠕虫和果蝇等均可用来构建学习记忆障碍模型,即使小鼠在表观上并不能表现出斑块沉积,但一些特殊的造模方法仍然能使小鼠脑内特定区域形成斑块沉积和神经元缠结,同时小鼠在实验可行性及经济方面的优势促使小鼠成为最常用的学习记忆障碍模型。除了文中提及的国内常用的东莨菪碱、亚硝酸钠、乙醇、D-半乳糖、 β 淀粉样沉积、脑缺血诱导的学习记忆障碍模型外,还可以用一些其他神经毒性物质来构建学习记忆障碍模型,如:6-羟基多巴胺、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢嘧啶(MPTP)、重金属等毒性物质^[22]。然而这些模型只是构建了一种疾病状态并没有模拟疾病的发生发展过程,因此研究者通过构建转基因小鼠来构建自发的学习记忆障碍模型,例如 APP/PS1 转基因小鼠与 AD 患者脑内均出现神经网络活动异常兴奋及海马代偿性产生的抑制^[23],这就表明 APP/PS1 转基因小鼠与 AD 患者具有高度相似的神经活动,为后面的机制研究和药物研发奠定了坚实的基础,然而实验条件及高昂的花费限制了这一模型的广泛应用。

构建好学习记忆障碍模型后,并不能直观的从动物的表型上判断出来,只能通过条件反射来区别。文中提及的跳台法、避暗法、Y 迷宫法都是基于被动逃避条件反射为基础的实验方法,它们具有操作简便、指标明确、易于观察等优点,然而在这些实验过程中有较多的主客观因素会对其造成影响,这就导致重复性差,而且即使模型成功、药效良好,它们的组间差异也较小。这就要求在实验过程中,应尽量保证外界环境及实验人员的稳定,目前行为学检测方法仍需进一步的完善。

参考文献

- [1] PLASSMAN BL, LANGA KM, FISHER GG, et al. Prevalence of dementia in the United States; the aging, demographics, and memory study[J]. *Neuroepidemiology*, 2007, 29(1/2):125-132.
- [2] RIEDEL G, KANG SH, CHOI DY, et al. Scopolamine-induced deficits in social memory in mice; reversal by donepezil[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 204(1):217-225.
- [3] 高莉,彭晓明,张富春,等.不同剂量东莨菪碱对小鼠学习记忆功能的影响[J]. *医药导报*, 2013, 32(5):573-576.
- [4] 张小超,何波,陈鹏,等.三七皂苷 Rg1 对学习记忆功能障碍的影响[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(3):13-16.
- [5] 徐博,安英,沈楠,等.北五味子醇提物对亚硝酸钠所致记忆巩固障碍模型小鼠记忆功能的影响[J]. *中国药物经济学*, 2013(1):34-35.
- [6] BAKER RC, KRAMER RE. Cytotoxicity of short-chain alcohols[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39:127-150.
- [7] NADER K, WANG SH. Fading in[J]. *Learn Mem*, 2006, 13(5):530-535.
- [8] REZAYOF A, ALIJANPOUR S, ZARRINDAST MR, et al. Ethanol state-dependent memory; involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 89(4):441-447.
- [9] YU SY, GAO R, ZHANG L, et al. Curcumin ameliorates ethanol-induced memory deficits and enhanced brain nitric oxide synthase activity in mice[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 44:210-216.
- [10] CHEN CF, LANG SY, ZUO PP, et al. Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2006, 31(7):805-811.
- [11] WU DM, LU J, ZHENG YL, et al. Purple sweet potato color repairs d-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 90(1):19-27.
- [12] TIAN J, ISHIBASHI K, ISHIBASHI K, et al. Advanced glycation endproduct-induced aging of the retinal pigment epithelium and choroid; a comprehensive transcriptional response[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(33):11846-11851.
- [13] 龚国清,徐赓本.小鼠衰老模型研究[J]. *中国药科大学学报*, 1991, 22(2):101-103.